Aus dem Hygienischen Institut der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Selter)

Ueber den Nachweis von Tuberkelbazillen im Sputum mit besonderer Berücksichtigung der Färbemethoden

nach Ziehl-Neelsen, Spengler und Hadziemmanuil.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät der Rheinischen
Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

vorgelegt am 29. Januar 1936 von

OTTO SCHNEIDER
Approb. Arzt aus Gevelsberg

GEVELSBERG i. W. 1936
Buchdruckerei Becker & Sohn, Gevelsberg

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Bonn

Referent: Prof. Dr. Selter

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Bei der Bedeutung, die der Tuberkulose in allen ihren Erscheinungsformen zukommt, ist es von großer Wichtigkeit, möglichst frühzeitig und exakt die Diagnose durch direkten Bazillennachweis sicher zu stellen, um dann die in Frage kommenden Fürsorgemaßnahmen und je nach Art der Erkrankung die entsprechende Therapie einzuleiten. Es steht noch nicht fest, ob man aus der Anzahl der gefundenen Bazillen Rückschlüsse auf die Schwere der Erkrankung ziehen und weiterhin die Prognosestellung abhängig machen kann.

Die tuberkulöse Infektion als Ursache eines Krankheitsprozesses erkennt man am sichersten dadurch, daß man nach einer besonderen Färbung mikroskopisch Tuberkelbazillen in den Ausscheidungen wie Sputum, Urin, Faeces, Eiter und Cerebrospinalflüssigkeit feststellt. Dieser mikroskopische Nachweis der Bazillen hat trotz anderer inzwischen herausgefundener diagnostischer Methoden nicht an Wert eingebüßt. Es ist jedoch nötig, daß die mikroskopische Untersuchung mit genügender Sorgfalt durchgeführt und auch eine ausreichende Anzahl Gesichtsfelder durchgesehen wird. Vor allem beim Sputum sind bei negativem Ausfall wiederholte Untersuchungen anzustellen. Häufig kommt es vor, daß die gebräuchlichsten Färbemethoden auch bei sehr erfahrenen Untersuchern nicht den gewünschten positiven Erfolg bringen. In solchen Fällen gelingt es nicht selten, durch Homogenisierung mit Antiformin selbst bei vorherigen Mißerfolgen noch Tuberkelbazillen nachzuweisen.

Die am meisten geübte Methode der Homogenisierung bleibt das von Uhlenhuth und Yylander eingeführte Anitiforminverfahren. Dadurch wird erreicht, daß einerseits die häufig sehr spärlich vorhandenen Bazillen sedimentiert und gesammelt, andererseits befreit werden, wenn sie in Zellen und dichten Schichten eingeschlossen sind. Bei der Vorbehandlung mit Antiformin muß man jedoch vorsichtig sein, da die Bazillen einer wenig virulenten Form bei zu langer Anreicherung und zu starker Konzentration leicht absterben, ihre Wachshülle aufgelöst wird, und sie somit ihre Säurefestigkeit verlieren, wodurch oft negative Resultate bedingt sind. Frankl fand bei 76 Fällen, wo mit der Ziehl-Neelsen-Methode keine Bazillen gefunden wurden, noch 13 Sputa positiv = 17%. Dagegen blieben 21 Exsudate,

6 Eiter und 5 Urine auch nach der Antiforminanreicherung negativ. Daraus scheint hervorzugehen, daß diese Methode besonders für Sputumuntersuchungen geeignet ist, vor allem dann, wenn es mit reichlich Schleim und Bronchialsekret gemischt ist. Müller berichtet sogar von 21,8 % Mehrausbeute bei Anwendung des Antiformverfahrens.

Methoden, die erheblich empfindlicher sind als das Färbeverfahren, stehen uns in der Kulturmethode und dem Tierversuch zur Verfügung. Vor allem erstere ist anzuwenden, wenn trotz wiederholter Untersuchung im gefärbten Sputumausstrich keine Bazillen gefunden wurden und man doch den Verdacht einer eventuellen Tuberkulose hat. R. Koch war es zuerst gelungen, aus verdächtigem Material mittels der Kulturmethode Tuberkelbazillen zu züchten. Er nahm dazu erstarrtes Serum. Die Bazillen wuchsen allerdings so langsam, daß in der Folgezeit nach neuen Nährboden gesucht wurde, mit deren Hilfe man viel schneller zum Ziele kam. Nocard und Roux beobachteten, daß das Glycerin das Wachstum der Bazillen außerordentlich günstig beeinflußte. 1888 führte Pawlowsky den Kartoffelglycerinnährboden ein, der lange Zeil als der beste galt. Eine erhebliche Verbesserung stellten die aus Hühnerei oder mit Eizusatz bereiteten Nährboden dar, die den Nachweis der Tuberkelbazillen in viel kürzerer Zeit als durch den Tierversuch ermöglichten und in ihrer Zuverlässigkeit dem Tierversuch ziemlich nahe kamen. Der erste brauchbare Eiernährboden, welcher aus Hühnerei, Glycerin und Gentianaviolett (letzteres zur Hemmung der Begleitbakterien) bestand, wurde von Petrof hergestellt. Ihm folgten andere Modifikationen von Löwenstein, Petragnani, Hohn u. a. Einen weiteren Fortschritt erreichte Löwenstein durch Behandlung des Untersuchungsmaterials mit verdünnter Schwefelsäure, wodurch es möglich war, die im Sputum stets vorhandenen Begleitbakterien abzutöten, ohne daß das Wachstum der Tuberkelbazillen gestört wurde. 1925 empfahl Schiller einen flüssigen Nährboden, der aus Glycerin und einer geringen Menge Glukose bestand. Nach seinen Angaben fand er mit Hilfe dieses Nährbodens bereits nach 24 bis 48 Stunden ein Wachstum und eine Vermehrung der Bazillen. Er beobachtete ferner, daß das regste Wachstum in die Zeit vom 1. bis 9. Tag fiel. Bei 27 mikroskopisch negativen Fällen konnte er 9 mal Tuberkelbazillenkulturen züchten. Schmidt und Sylla unter-

suchten färberisch negative Sputa nach der von Schiller angegebenen Methode, erzielten jedoch bei weitem nicht die günstigen Resultate, die Schiller angegeben hatte. Auch andere Autoren fanden bei dieser Methode keine wesentlichen Vorteile.

Kristensen und Jensen gelang es, auf dem von Petrof eingeführten Nährboden bei 52 negativen Fällen verschiedensten Materials 8 mal Tuberkelbazillen zu züchten. Bei 76 Fällen, die nach Ziehl-Nellsen sicher negativ waren, fand Frankl nach der Hohn-Löwenstein-Kulturmethode noch 36 Präparate positiv = 47,3 % Mehrausbeute. Lange erzielte sogar 50 % positive Resultate. Sonnenschein untersuchte 199 färberisch negative Sputumproben nach der Höhn-Löwenstein-Methode und konnte dabei noch in 48 Sputa Bazillen nachweisen. Von 23,3 % Mehrausbeute berichtet Krause bei 120 wiederholt negativen Präparaten nach Ziehl-Neelsen. Die Untersuchungen, die Schmidt anstellte, zeigten, daß die ersten sichtbaren Kulturen am 9. Tag auftraten, in einem Fall begann das Wachstum erst nach 36 Tagen. Frankl beobachtete die ersten sichtbaren Kulturen am 8. Tag. Die Maximalzeit betrug 40 Tage. Erst dann legte er Kulturen an, wenn das Material nach wöchentlichen färberischen Untersuchungen negativ war. Dabei machte er wiederholt die Feststellung, daß bei einer progredienten Erkrankung die Kulturen schneller und üppiger wuchsen, als bei einem Prozeß mit guter Heilungstendenz. Bei gebessertem klinischen Befund nach einer Kur wuchsen die Kulturen sehr langsam, zum Teil überhaupt nicht mehr, oder starben früh ab. Die Ergebnisse glaubt er für die Prognose entsprechender Krankheitsbilder verwerten zu können.

Dem mikroskopischen Nachweis haften bei der Diagnosestellung einige Gefahren an. Es können außer den Tuberkelbazillen „fremde" säure - alkoholfeste Bakterien, wie Smegma- oder Leprabazillen, im Untersuchungsmaterial vorhanden sein. Außerdem kann die Diagnose erschwert werden durch säurefeste apathogene Stäbchen, wie wir sie an Wasserleitungshähnen, in altem destilliertem Wasser oder an sonstigen Gegenständen, die wir für die Untersuchung benötigen, nicht selten antreffen. Zu beachten ist ferner, daß durch Färbung allein einzelne Stäbchen nicht mit Sicherheit als Tuberkelbazillen identifiziert werden können. Diese Fehlerquellen werden ausgeschaltet durch den Tierversuch, bei dem man jedoch längere Zeit zur Diagnosestellung gebraucht. Zum Tierversuch verwendet man gewöhnlich

Meerschweinchen. Das zu untersuchende Material wird unter die Haut injiziert. Je nach dem Grade der Virulenz oder der Menge der einverleibten Erreger erkranken die regionären Lymphdrüsen früher oder später. In vielen Fällen ist es schon nach 2 bis 3 Wochen möglich, eine Vergrößerung der Drüsen durch Palpation zu erkennen. Infolgedessen wird bei den meisten Untersuchungstellen der subkatanen Einverleibung des Materials der Vorzug gegeben, weil bei intraperitonealer Impfung ohne Sektion meist nicht festzustellen ist, ob die Infektion angegangen ist oder nicht. Im allgemeinen erhält man erst nach 4 bis 6 Wochen ein positives Ergebnis. Begreiflicherweise wurden daher Methoden angegeben, die es ermöglichten, den Nachweis der tuberkulösen Erkrankung schneller zu bringen, um dann die entsprechende Therapie früher einleiten zu können. Es wurde das Verfahren der Drüsenquetschung empfohlen, das jedoch den Nachteil hat, daß es nicht spezifisch ist, da auch andere Bakterien Drüsenschwellungen hervorrufen können. Teilweise ging man auch dazu über, das verdächtige Material in die Leber einzuspritzen. Günstige Resultate wurden weiter dadurch erzielt, daß man die Versuchstiere vor oder nach der Injektion einer starken Röntgenbestrahlung unterwarf. Bei dieser Methode werden jedoch die Tiere für sekundäre Infektionen empfänglicher. Durch Vorbehandlung des Materials mit Natronlauge und Einspritzen in die Jugularvenne konnten bei einem anderen Verfahren bereits nach 10 bis 14 Tagen makroskopisch tuberkulöse Veränderungen festgestellt werden. Durch Injektion des Untersuchungsmaterials in den Hoden, bezw. in die Brustdrüse säugender Meerschweinchen sind weiterhin gute Erfolge erzielt worden. Doch dürfte man gerade bei dem letzten Verfahren in der Praxis einigen Schwierigkeiten begegnen. Den ganzen Bestrebungen, den Ablauf des Tierversuchs zu beschleunigen, haften immer noch Mängel an. Es hat sich dabei bis heute noch keine Verbesserung im Sinne einer Verkürzung der Beobachtungszeit durchgesetzt, sodaß wir in der Regel trotz allem auf eine 4 bis 6-wöchentliche Beobachtungszeit angewiesen sind.

Die Frage der Sicherheit und Ergiebigkeit einmal der Züchtung und zum andern des Tierversuchs ist oft diskutiert worden. Viele Autoren sind der Ansicht, daß trotz guter Erfolge mittels der Kulturmethode der Tierversuch überlegen ist. So berichtet V e r d i n a, daß bei 137 negativen Proben noch in

14 % der Fälle der Nachweis der tuberkulösen Erkrankung erbracht werden konnte, nachdem das Untersuchungsmaterial dem Meerschweinchen injiziert worden war. Bei 35 negativen Sputumproben nach der Färbemethode gelang es Schmidt und Sylla, mit dem Tierversuch in 8 Fällen Bazillen nachzuweisen, während bei der Züchtung auf dem Petrof'schen Nährboden nur 2 Präparate positiv waren. Nach ihrer Ansicht bleibt die Verimpfung des verdächtigen Materials auf Meerschweinchen das zuverlässigste und feinste Reagens auf Tuberkelbazillen. Seige weist ebenfalls darauf hin, daß bei Versagen des färberischen Nachweises der Koch'schen Baziallen nach Antiforminanreicherung die Kulturmethode und der Tierversuch anzustellen sind, wobei auch er wegen der größeren Empfindlichkeit dem Tierversuch den Vorzug gibt. Lewinthal impfte Meerschweinchen mit kleinsten Bazillenmengen. Nach seinen Angaben erkrankte ein Versuchstier durch 2 (vielleicht 3) Bazillen, ein weiteres durch einen (vielleicht 2) und ein drittes durch einen einzigen Keim. Damit glaubt er den Beweis erbracht zu haben, daß ein einzelner Bazillus imstande ist, eine Infektion im Meerschweinchenkörper hervorzurufen. Man müsse den Tierversuch als die feinste Reaktion auf Tuberkelbazillen ansprechen.

Gegenüber den letztgenannten Autoren erzielte Roloff mittels der Kulturmethode nach Hohn-Löwenstein bei färberisch negativen Proben eine erhebliche Mehrausbeute an positiven Ergebnissen. Sie stand dem Tierversuch kaum nach. Er lobt die Einfachheit, den Zeitgewinn und die Wirtschaftlichkeit der Kulturmethode, sie sei daher bei verdächtigem tinktoriell negativem Material besonders zu empfehlen. Vergleichende Untersuchungen, die Frankl bei Sputumproben anstellte, die nach den üblichen Färbeverfahren keine Tuberkelbazillen aufwiesen, ergaben ungefähr gleich hohe Werte (50 %) sowohl mit der Kulturmethode als auch mit dem Tierversuch. Er untersuchte jedes Material gleichzeitig kulturell wie auch mit dem Tierversuch und konnte dabei feststellen, daß in ebenso viel Fällen einmal das Kulturverfahren versagte wie auch nicht immer mit dem Tierversuch Bazillen gefunden wurden. Die besten Ergebnisse erziele man, wenn man gleichzeitig beide Methoden anwende.

Trotz der eben genannten verfeinerten diagnostischen Methoden ist der direkte Nachweis der Bazillen mittels Färbeverfahren, vor allem bei verdächtigem Sputum, als erste vor-

zunehmende Maßnahme angezeigt und wird auch für Krankenhäuser, Fürsorgestellen und den praktischen Arzt weiterhin die Methode der Wahl bleiben, da er ein relativ gutes Resultut gibt, einfacher ist und weniger Zeit erfordert. Für das Kulturverfahren und den Tierversuch muß außerdem eine entsprechende Einrichtung vorhanden sein.

Um möglichst alle Bazillenausscheider zu erfassen, und sie dann einer spezifischen Behandlung zuzuführen, bezw. sie wegen der Gefahr der Weiterverbreitung isolieren zu können, haben die Färbemethoden zum mikroskopischen Nachweis im Laufe der Zeit Verbesserungen erfahren. Zum größten Teil handelt es sich dabei um Modifikationen ursprünglicher Methoden, mit denen die Autoren günstigere Resultate erzielten. Jedes Verfahren, das es uns ermöglicht, bessere Erfolge zu erreichen, muß uns willkommen sein.

In der Literatur der letzten Jahre finden wir immer noch das bekannte und verbreitete Ziehl-Neelsen-Verfahren mit Vorliebe angewandt. Nach ihm wird das luftgetrocknete, durch Hitze fixierte Sputumpräparat mit Karbolfuchsin überdeckt und vorsichtig bis zur Dampfbildung über der Gasflamme zwei Minuten lang erwärmt. Danach spült man es mit Wasser ab und entfärbt es so lange mit 3% Salzsäurealkohol, bis es farblos erscheint. Dann wird das Präparat wieder mit Wasser abgespült und eine halbe Minute mit verdünnter Methylenblaulösung nachgefärbt. Erneutes Abspülen mit Wasser und Trocknen zwischen Filtrierpapier. Die Koch'schen Bazillen haben die Eigenschaft, einmal angenommene Farben festzuhalten. Versucht man, sie durch Säuren oder Alkohol zu entfärben, so gelingt das nicht, d. h. sie sind säure- und alkoholfest. Für diese Fähigkeit ist mit großer Wahrscheinlichkeit die die Bazillen umgebende Wachshülle verantwortlich zu machen. Während bei der Ziehl-Neelsen-Färbung alles außer den Tuberkelbazillen blau gefärbt erscheint, heben sich diese als rot tingierte Stäbchen vom blauen Untergrund ab. Sie sind sehr verschieden in ihrem Aussehen. Dem untersuchenden Auge erscheinen sie manchmal als lange dünne Stäbchen, mitunter sind sie auch plump und dick. Sie sind grade, können jedoch gekrümmt; gebogen und teilweise geknickt sein. Es kommt vor, daß man im mikroskopischen Bild eine zarte Hülle sieht, in die rötlich gefärbte kleine Körnchen eingelagert sind. Bei den Untersuchungen war es auffallend,

daß diese Körnchen häufig an den Enden der Bazillen stärker konzentriert waren und so dem Bilde von Polkörperchen glichen. Oft liegen die Stäbchen regellos im Blickfeld verteilt, parallel oder übereinander, in Gruppen angeordnet oder einzeln, ziehen auch manchmal wie kurze Fäden dahin, nur durch kleine Lücken unterbrochen.

C. Spengler gab im Jahre 1907 ein neues Färbeverfahren an. Nach der üblichen Vorfärbung mit Karbolfuchsin beizte er das Präparat eine halbe Minute mit Pikrinsäurealkohol. Er entfärbte den Ausstrich mit 15proz. Salpetersäure bis er farblos erschien. Danach wurde das Präparat mit Wasser abgespült und eine Minute lang mit Pikrinsäurealkohol nachgefärbt. Durch Verwendung von Salpetersäure glaubte er die im Ausstrich außer den Tuberkelbazillen vorhandenen Sputumbestandteile, wie nicht säurefeste Bakterien, Gewebszellen und Schleimelemente besser entfärben, ja zum Teil auflösen zu können. Die Entfärbung des Präparates nach der Spengler-Methode dauert jedoch ziemlich lange und erfordert je nach der Dicke der Schicht eine schwankende Zeit. Auch bei diesem Färbeverfahren zeigen sich die Tuberkelbazillen als Stäbchen, die sich leuchtend rot vom hellgelben, gleichmäßig tingiertem Untergrund scharf abheben. Durch Drehen an der Mikrometerschraube erscheinen die Bazillen in verschiedenen Ebenen der Sputumschicht, da, wie oben schon erwähnt, die Salpetersäure zelluläre Elemente auflöst, und so auch die Stäbchen in den tieferen Schichten des Ausstrichs zu sehen sind. Bei der Ziehl-Neelsen-Färbung dagegen sind häufig Bazillen von Leukozyten nicht säurefesten Bakterien und Schleimbestandteilen, die das kräftige Methylenblau angenommen haben, so stark überlagert, daß sie dem untersuchenden Auge entgehen können, bezw. ihr Auffinden viel schwerer ist als bei dem Spengler-Verfahren. Die Splitter, die nach Spengler „eine an der Grenze der Vitalität angelangte Wuchsform der Tuberkelbazillen“ sind, zeigen sich ebenfalls leuchtend rot auf dem hellgelben Untergrund. Für Spengler haben die Splitter nur dann einen Wert bei der Diagnosestellung, wenn sie nicht einzeln, sondern in Gruppen zusammenliegend gefunden werden. In diesem Zusammenhang möchte ich erwähnen, daß kleine Kratzer und Defekte im Objektträger Stäbchen und Splitter vortäuschen können, da das Karbolfuchsin trotz Entfärbung mit Salpetersäure bezw. mit Salzsäurealkohol in

ihnen haften bleiben kann und so zu falschen Diagnosen führt. Es empfiehlt sich daher prinzipiell, für die Untersuchungen auf Tuberkelbazillen neue Objektträger zu verwenden. Auch das zur Färbung benutzte Karbolfuchsin muß frisch zubereitet oder filtriert sein, damit man nicht durch Farbniederschläge bei der Diagnosestellung irregeführt wird.

Im Laufe der Zeit sind manche Modifikationen der oben angeführten Färbeverfahren nach Ziehl-Neelsen und Spengler angegeben worden. Alle unterscheiden sich von den ursprünglichen Methoden entweder durch das Entfärbungs- oder durch das Gegenfärbungsmittel. Die Autoren dieser Modifikationen erzielten durchweg mit ihrem Verfahren günstigere Resultate. Konrich veröffentlichte 1920 eine Modifikation der Ziehl-Neelsen-Methode, wobei er nicht wie jener mit Salzsäurealkohol entfärbt, sondern das Fuchsin mit einer 10%-wässrigen Natriumsulfitlösung reduziert. Bei der Nachfärbung besteht ebenfalls ein Unterschied insofern, als Konrich nicht Methylenblau sondern Malachitgrün anwendet. Seine Methode empfiehlt er aus zwei Gründen: erstens sei das Natriumsulfit viel billiger als der Alkohol und zweitens erkenne unser Auge den Gegensatz rot — grün viel besser als den von rot und blau. Dadurch sei das Durchmustern der Präparate und Herausfinden einzelner Bazillen wesentlich erleichtert. Die Konrich-Methode wurde von Schulte-Tigges dahingehend modifiziert, daß er zum Nachfärben statt Malachitgrün wässrige konzentrierte Pikrinsäurelösung gebrauchte. Er fand bedeutend mehr Bazillen im Präparat als bei der Färbung nach Ziehl-Neelsen, häufig auch noch, wenn der Auswurf nach Ziehl negativ war. Jötten und Haarmann erzielten mit einer modifizierten Spengler-Färbung günstigere Resultate. „Nach der üblichen Vorfärbung mit Karbolfuchsin wird die Entfärbung mit 15% Salpetersäure ca. 20 Sekunden lang vorgenommen, dann wird das Präparat kurz mit Wasser abgespült und weiter 10 Sekunden mit Salpetersäure behandelt, darauf wieder abgespült und ca. 30 Sekunden lang mit Spenglers Pikrinsäurealkohol nachgefärbt. Nach abermaliger Wasserspülung wird das Präparat getrocknet und ist so mikroskopierfertig.“ Sie fanden nach ihrer Methode von 170 Sputumproben 62 positiv, während nach Spengler 61 und nach Ziehl-Neelsen nur 59 Präparate positiv waren. Die durchschnittlich im Gesichtsfeld gefundene Anzahl Bazillen betrug nach

ihrem Verfahren 31, während die nach Spengler gefärbten Ausstriche 26, die nach Ziehl - Neelsen sogar nur 13 Stäbchen aufwiesen. Bei ihrer Modifikation sei vor allen Dingen die umständliche und zeitraubende Färbungsweise umgangen und zwar bei gleichen, wenn nicht sogar besseren Resultaten.

Spreitzer konnte bei 50 positiven Sputumproben durchschnittlich in einem Gesichtsfeld nach Ziehl - Neelsen 5,76, nach Jötten - Haarmann 13,04 und nach der Konrich-Methode 14,94 Bazillen nachweisen. Den einzigen Nachteil der Konrich-Methode sieht er darin, daß sie für Rot - Grün - Blinde nicht in Frage kommt. Bernblum stellt das Konrich-Verfahren der Ziehl-Neelsen-Färbung ebenbürtig an die Seite. Fast in allen Gesichtsfeldern waren im Durchschnitt mehr Bazillen vorhanden als nach Ziehl-Neelsen. Er rühmt vor allen Dingen den Farbgegensatz rot-grün. Die Tuberkelbazillen seien scharf umrissen, alles übrige verwaschen. Die Durchsicht der Präparate sei dadurch erleichtert und das Herausfinden vereinzelter Bazillen besser möglich. Geschke stellte 1922 vergleichende Untersuchungen über Färbemethoden für Tuberkelbazillen an. Die Zahl der positiven Sputa betrug von 56 Proben nach Ziehl-Neelsen 54. Alle waren dagegen positiv nach: Spengler, Jötten-Haarmann, Schulte - Tigges und Konrich. Noch günstigere Resultate erhielt er jedoch bei der Gesamtdurchschnittszahl für ein Gesichtsfeld. Es ergaben sich folgende Werte: Spengler 25,2, Jötten - Haarmann 23,7, Schulte - Tigges 14,2 und Konrich 9,3 Bazillen. Bei Ziehl - Neelsen wurden nur 4,7 Stäbchen im Gesichtsfeld gefunden.

1934 veröffentlicht Hadziemmanuil eine neue Modifikation der Ziehl - Neelsen - Methode. Wie alle andern Autoren färbt auch er das Präparat 2 Minuten mit heissem Karbolfuchsin. Das Präparat wird darauf mit Salpetersäurealkohol (10 proz.) entfärbt und mit Wasser abgespült. Dann wird es weiter entfärbt mit 10 proz. Natriumsulfitlösung bis zum völligen Schwund der roten Färbung. Erneutes Abspülen mit Wasser und Gegenfärbung mit einer 0,005 proz. ($^1/_{100}$) Methylenblaulösung 1 bis 2 Sekunden. Bei 100 untersuchten Sputa waren nach Ziehl-Neelsen 22 Präparate positiv, nach seiner Methode jedoch 28 = 21,43% Mehrausbeute. Auch bei vergleichenden Untersuchungen nach Ziehl-Neelsen und Spengler fand er von 310 Proben nach der ersten Methode 163, 166 Sputa jedoch nach Spengler positiv. Die relativ hohen

positiven Werte, die Hadziemmanuil nach seinem Verfahren erziehlt, führt er darauf zurück, dass einmal durch den Salpetersäurealkohol und durch die 10 proz. Natriumsulfitlösung eine bessere Entfärbung der ausser den Tuberkelbazillen vorhandenen Sputumbestandteile erreicht wird, zum andern durch die schwache 0,005 % Methylenblaulösung keine Bazillen in den unteren Ausstrichschichten überfärbt werden. Ausserdem sei die Untersuchung der Präparate durch den Gegensatz rot - hellblau bequemer und für das Auge angenehmer.

Da die Färbemethode doch noch eine große Rolle spielt, ist es nicht ohne Interesse, jedes neue Verfahren auf seine Brauchbarkeit zu prüfen. Um den Wert der Hadziemmanuil-Methode zu bestimmen, wurden vergleichende Untersuchungen mit Ziehl - Neelsen und Spengler bei 100 Sputumproben durchgeführt, die von der Medizinischen Klinik und der Poliklinik in Bonn, vom Untersuchungsamt des Hygienischen Instituts der Universität Bonn, und zum Teil von der Lungenheilstätte Hohenhonnef zur Verfügung gestellt wurden.

Unsere Untersuchungen ergaben relativ hohe positive Werte, da die Sputumproben größtenteils aus Krankenanstalten mit offen Tuberkulösen kamen. Die Zahl der positiven Befunde war bei den 3 Untersuchungsmethoden verschieden hoch. Sie betrug nach:

Ziehl-Neelsen	66
Spengler	70
Hadziemmanuil	73

In Tabelle I sind die Werte nach der Ziehl - Neelsen-Methode aufgeführt, wobei auch die Sputa berücksichtigt wurden, die nach Ziehl negativ, nach Spengler und Hadziemmanuil jedoch positiv waren. Die Zahl der Bazillen in 10 Gesichtsfeldern wurde addiert, und aus der Summe der Bazillen wurde die Durchschnittszahl für ein Gesichtsfeld bestimmt.

Tabelle I

Ziehl-Neelsen.

Sputum Nr.	Zahl der Bazillen in 10 Gesichtsfeldern	Sputum Nr.	Zahl der Bazillen in 10 Gesichtsfeldern
1	—	38	82
2	285	39	143
3	76	40	70
4	214	41	2
5	63	42	12
6	367	43	218
7	412	44	163
8	186	45	34
9	87	46	155
10	—	47	418
11	66	48	18
12	94	49	247
13	139	50	162
14	116	51	17
15	152	52	—
16	58	53	119
17	97	54	27
18	35	55	43
19	74	56	383
20	111	57	31
21	123	58	54
22	116	59	230
23	102	60	183
24	—	61	503
25	378	62	492
26	24	63	312
27	230	64	118
28	199	65	418
29	29	66	—
30	7	67	154
31	54	68	23
32	17	69	59
33	—	70	76
34	32	71	12
35	55	72	91
36	43	73	437
37	—		9545

Nach Ziehl-Neelsen waren demnach 66 Präparate positiv. Die Gesamtbazillenzahl in 660 Gesichtsfeldern betrug 9545. In einem Gesichtsfeld waren also 9545: 660 = 14,5 Bazillen im Durchschnitt vorhanden.

Tabelle II zeigt uns die Werte, die bei der Färbemethode nach Spengler gefunden wurden, wobei auch die negativen Sputa berücksichtigt wurden, die nach Hadziemmanuil positiv waren.

Tabelle II

Spengler:

Sputum Nr.	Zahl der Bazillen in 10 Gesichtsfeldern	Sputum Nr.	10 Gesichtsfeldern Zahl der Bazillen in
1	22	38	113
2	321	39	319
3	213	40	93
4	297	41	17
5	217	42	9
6	97	43	267
7	386	44	24
8	217	45	44
9	229	46	126
10	56	47	377
11	148	48	47
12	63	49	291
13	157	50	216
14	88	51	79
15	380	52	2
16	53	53	136
17	133	54	21
18	83	55	68
19	182	56	416
20	157	57	42
21	152	58	97
22	78	59	167
23	167	60	290
24	—	61	547
25	408	62	536
26	11	63	355
27	372	64	135
28	358	65	523
29	37	66	—
30	14	67	208
31	23	68	35
32	19	69	134
33	—	70	43
34	27	71	8
35	71	72	145
36	18	73	460
37	14		11658

Nach Spengler waren demnach 70 Präparate positiv. Die Gesamtbazillenzahl in 700 Gesichtsfeldern betrug 11658. Im Durchschnitt waren also in einem Gesichtsfeld 11658 : 700 = 16,6 Bazillen vorhanden.

Zum Schluß finden wir in Tabelle III die Ergebnisse aufgeführt, die mit der Hadziemmanuil-Methode erreicht wurden.

Tabelle III

Hadzienmmanuil.

Sputum Nr.	Zahl der Bazillen in 10 Gesichtsfeldern	Sputum Nr.	Zahl der Bazillen in 10 Gesichtsfeldern
1	35	38	179
2	98	39	420
3	358	40	137
4	470	41	36
5	1643	42	43
6	436	43	416
7	401	44	181
8	757	45	134
9	447	46	198
10	67	47	722
11	563	48	62
12	317	49	437
13	406	50	234
14	261	51	54
15	512	52	7
16	120	53	182
17	192	54	69
18	116	55	71
19	193	56	702
20	322	57	69
21	213	58	123
22	84	59	312
23	173	60	207
24	19	61	577
25	716	62	529
26	127	63	372
27	406	64	190
28	264	65	590
29	61	66	16
30	18	67	176
31	31	68	47
32	27	69	223
33	14	70	45
34	116	71	22
35	145	72	227
36	39	73	526
37	32		18734

Nach dem Färbeverfahren von Hadzienmanuil waren somit 73 Ausstriche positiv. Berechnet man für diese Methode die im Durchschnitt in einem Gesichtsfeld vorhandenen Bazillen, so ergibt sich ein Wert von 18734 : 730 = 25,7

Wie aus den Tabellen ersichtlich, waren von den 100 untersuchten Sputa nach der Ziehl - Neelsen - Methode 66, nach der von Spengler 70 und schließlich nach dem von Hadziemanuil angegebenen Färbeverfahren 73 Präparate positiv. Die Mehrausbeute gegenüber Ziehl - Neelsen belief sich bei Spengler auf 4 = 5,9 % bei Hadzienmmanuil auf 7 Ausstriche = 9,6 %. Nach der Hadziemmanuil - Methode wurden also noch 4,1 % mehr positive Resultate erzielt als bei Spengler. Wie weiterhin aus den Tabellen hervorgeht, zeigte sich die Ueberlegenheit der beiden letzten Verfahren nicht nur in der Zahl der positiven Sputa, sondern auch in der Zahl der im Gesichtsfeld gefundenen Bazillen. Sie wurde bestimmt aus der Summe der Stäbchen, die in 10 Gesichtsfeldern aller positiven Präparate bei den 3 Untersuchungsmethoden gefunden wurden. Dabei ergab sich folgendes Bild:

Ziehl-Neelsen . . .	14,5
Spengler	16,6
Hadziemmanuil	25,7

Bazillen durchschnittlich in einem Gesichtsfeld.

Obwohl die vorliegenden Untersuchungen nur in beschränktem Umfange vorgenommen wurden, so zeigen sie doch, daß durch das Färbeverfahren nach Hadziemmanuil eine größere Ausbeute erzielt werden konnte. Demnach ist die Methode von Hadziemmanuil für die Praxis durchaus zu empfehlen. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß auch mit den besten Färbeverfahren nicht alle Bazillenausscheider erfaßt werden können. Allgemein ist es bekannt, daß unter Umständen nur ganz vereinzelte Bazillen im Sputum vorkommen können, die dann selbst in einer großen Anzahl von Präparaten bei stundenlanger Durchsicht nicht gefunden werden. Außerdem findet die Bazillenausscheidung sehr oft nicht kontinuierlich, sondern schubweise statt. Sofern nur ein geringer klinischer Verdacht besteht, ist in solchen Fällen die Kulturmethode unbedingt dem färberischen Nachweis überlegen, da hierbei möglicherweise ein einzelner oder nur wenige Bazillen erkannt werden können. Das Kulturverfahren steht, wie oben bereits gesagt, dem Tierversuch an Zuverlässigkeit kaum nach, vielfach wird es sogar als dem Tierversuch gleichwertig angesprochen, vor allem bei Sputumuntersuchungen.

Zusammenfassung.

Trotz der großen Mehrausbeute, die man mit der Kulturmethode und dem Tierversuch erreicht, hat das Färbeverfahren seinen diagnostischen Wert in keiner Weise eingebüßt. In Verdachtsfällen wird man nach wie vor zuerst versuchen müssen, durch Färbung mikroskopisch Bazillen im Sputum zu finden. Auf Grund der in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse muß man zu dem Schluß kommen, daß in erster Linie die Methode nach Hadziemmanuil, dann aber auch die Spengler-Methode dem Färbeverfahren nach Ziehl - Neelsen überlegen sind, und deshalb zum färberischen Nachweis der Tuberkelbazillen besonders empfohlen werden können.

Zum Schlusse meiner Arbeit möchte ich mir gestatten, meinem Referenten, Herrn Professor Dr. Selter, für seine persönliche Beratung und Anregung, sowie auch das mir zur Verfügung gestellte Material meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Literaturverzeichnis.

Bernblum: Zentralblatt für Bakteriologie, Band 87, Seite 23

Frankl: Zeitschrift für Tuberkulose Bd. 69, S. 7 - Bd. 72, S. 200

Geschke: Zeitschrift für Tuberkulose Bd. 36, Heft 5

Hadziemmanuil: Klinische Wochenschrift 1934, Seite 991

Hohn: Münchener Medizinische Wochenschrift 1926, Seite 609

Jötten und Haarmann: Münchener Medizinische Wochenschrift 1920, Seite 692

Koch: Berliner Klinische Wochenschrift 1882, Band 15, S. 221

Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt 1884, Band 2, Seite 66

Konrich: Deutsche Medizinische Wochenschrift 1920, S. 741

Krause: Zeitschrift für Tuberkulose, Band 54, Seite 227

Kristensen und Jensen: Zentralblatt für die gesamte Tuberkuloseforschung, Band 23, Heft 1—2

Lange: Beiträge zur Klinik der Tuberkulose, Band 69, S. 179

Lange, L.: Handbuch der pathog. Mikroorganismen von Kolle und Wassermann, Band 10, Seite 358

Lewinthal: Zeitschrift für Hygiene, Band 107, Seite 387.

Löwenstein: Zeitschrift für Tuberkulose, Band 7, Seite 491

Müller: Zeitschrift für Tuberkulose, Band 44, Seite 318

Nocard und Roux: Ann. Inst. Pasteur 1887, Band 1, Seite 19

Pawlowsky: Ann. Inst. Pasteur 1888, Band 2, Seite 203

Petragnani: Boll. Ist. sieroter. milan. 1926, Fasc. 3

Petrof: John Hopkin's Hosp. Bulletin 1915

Roloff: Zeitschrift für Tuberkulose, Band 52, Seite 153

Schiller: Zentralblatt für Bakteriologie, Band 96, Heft 2

Schmidt und Sylla: Zeitschrift für Tuberkulose, Band 45, Seite 370

Schulte - Tigges: Deutsche Medizinische Wochenschrift 1920, Seite 1225

Seige: Archiv für Hygiene 1928, Seite 14

Sonnenschein: Münchener Medizinische Wochenschrift 1927, Seite 1540

Spengler: Deutsche Medizinische Wochenschrift 1907, Heft 9
Zeitschrift für Hygiene Band 49, Seite 542

Spreitzer: Zentralblatt für Bakteriologie, Band 86, S. 458

Uhlenhuth und Xylander: Berliner Klinische Wochenschrift 1908, Nr. 29

Verdina: Ref. Fortschr. d. M. 1929, Seite 416

Ziehl - Neelsen: Lehrbuch der Bakteriologie von Dr. L. Heim, Seite 435

Lebenslauf.

Ich, Otto Schneider, wurde am 6. September 1909 in Gevelsberg i. W. geboren als Sohn des Schneidermeisters Karl Schneider und seiner Ehefrau Emma, geb. Michael. Von 1916 bis 1920 besuchte ich die Volksschule und dann das Realgymnasium meiner Vaterstadt, das ich Ostern 1929 mit dem Zeugnis der Reife verließ. Ich studierte Medizin in Marburg, Köln und Bonn. Im Herbst 1931 bestand ich in Marburg die ärztliche Vorprüfung und am 19. Dezember 1934 das medizinische Staatsexamen in Bonn. Während des praktischen Jahres arbeitete ich am Hygienischen Institut in Bonn, an den Städt. Krankenanstalten in W.-Barmen und an der inneren und chirurgisch-gynäkologischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses zu Gevelsberg. Am 15. Januar 1936 bekam ich in Bonn meine Approbation als Arzt.